

P26795

10/525831
DT01 Rec'd PCT/PT 25 FEB 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : T. NAKATSURA et al.

Appl. No: : Not Yet Assigned

PCT Branch

Filed : Concurrently Herewith

PCT/JP2003/011049

For : CANCER ANTIGEN AND USE THEREOF

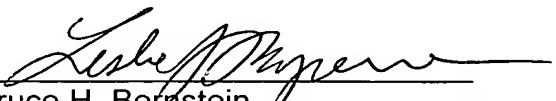
CLAIM OF PRIORITY

Commissioner for Patents
U.S. Patent and Trademark Office
Customer Service Window, Mail Stop _____
Randolph Building
401 Dulany Street
Alexandria, VA 22314

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 and 365 based upon Japanese Application Nos. 2002-255668 filed 30 August 2002 and 2002-341168 filed 25 November 2002. The International Bureau already should have sent certified copies of the Japanese applications to the United States designated office. If the certified copies have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
T. NAKATSURA et al.



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

Leslie J. Paperner
Reg. No. 33,329

February 25, 2005
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1950 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

09.10.03 #2

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-255668
[ST. 10/C]: [JP2002-255668]

出 願 人
Applicant(s): 財団法人くまもとテクノ産業財団

REC'D 27 NOV 2003

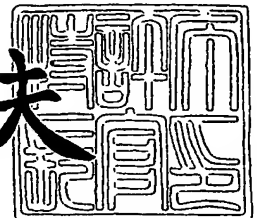
WIPO PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月13日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 KTL-052

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県菊池郡合志町豊岡 2 5 2 7 - 4 6 4

 【氏名】 中面哲也

【発明者】

 【住所又は居所】 熊本県熊本市長嶺西 2 丁目 9 - 5 2

 【氏名】 西村泰治

【特許出願人】

 【識別番号】 801000050

 【氏名又は名称】 財団法人くまもとテクノ産業財団

 【代表者】 潮谷 義子

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 167417

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脾癌・大腸癌の抗原、抗原をコードするDNA、ペプチド、蛋白、該抗原により誘導される抗体、キラーT細胞、およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白からなる抗原。

【請求項2】 請求項1記載の蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド。

【請求項3】 ペプチドが下記(1)～(5)式からなるアミノ酸配列のペプチドであることを特徴とする請求項2記載のペプチド。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu … (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu … (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile … (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu … (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile … (5)

【請求項4】 請求項2～3記載のペプチドからなる抗原。

【請求項5】 配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA。

【請求項6】 請求項2～3記載のペプチドとアジュバントとからなる抗癌ワクチン。

【請求項7】 請求項5記載のDNAからなる抗癌ワクチン。

【請求項8】 請求項7記載のDNAとアジュバントとからなる抗癌ワクチン。

【請求項9】 請求項1記載の蛋白、またはその一部をエピトープとする抗体。

【請求項10】 請求項1記載の蛋白の一部、または請求項2のペプチドをエピトープとし、インビトロ刺激により誘導されたキラーT細胞。

【請求項11】 請求項1記載の蛋白のインビトロ刺激により誘導されたCD4陽性ヘルパーT細胞。

【請求項12】 請求項5記載のDNAからなる脾癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断用

プローブ。

【請求項 13】請求項 12 記載の癌の診断用プローブ及び／又は請求項 9 記載の抗体を含有することを特徴とする膵癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断薬。

【請求項 14】請求項 9 記載の抗体、及び／または請求項 10 記載のキラー T 細胞を含有することを特徴とする膵癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の治療薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、膵癌・大腸癌を含む各種癌の診断や免疫療法などに有用な新規なヒト膵癌・大腸癌抗原、及びその利用等に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在、死亡原因の第一位となっている癌においては、その発生機序、診断法、治療法が進歩したにもかかわらず、未だに多くの進行癌を治療できないのが現状である。これを改善するためには、新しい早期診断法と治療法の開発が必要とされている。

【0003】

癌の治療法として免疫療法は古くから期待され、様々な試みがなされてきたが、まだ十分な抗腫瘍効果を示すには至っていない。従来、癌の免疫療法は非特異的免疫療法を中心として行われてきたが、近年、T細胞が生体内での腫瘍拒絶に重要な役割を果たすことが明らかになり、細胞傷害性 T 細胞 (CTL: cytotoxic T lymphocyte) を誘導しうる T 細胞認識腫瘍抗原の単離と MHC クラス I 拘束性エピトープの決定に努力がそそがれている。

【0004】

従来、多くの腫瘍抗原の単離として CTL を用いた cDNA 発現クローニン

グ法で行われてきたが、腫瘍の細胞株化とCTLの樹立が必要であることから、メラノーマ以外の癌腫からの腫瘍抗原の単離は困難である。また、免疫治療法の効果を上げるために、多くのペプチドをミックスした治療法が有効と考えられているが、それを確立するためには、数多くの抗原の単離が必要であり、従来のcDNA発現クローニング法は、1つの抗原の単離に多くの労力と時間を費やすという問題があった。

【0005】

1995年にドイツのPfreundschuhや米国のOldらのグループにより、癌患者血清中の抗体が認識する癌抗原タンパクを検出するSEREX法(serological identification of recombinant cDNA expression cloning; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11810-11813, 1995)が報告されている。この方法によって多くの腫瘍抗原が単離されているが、本方法を用いて単離された抗原の中にはCTLを誘導するMAGE-1やチロシナーゼなどの抗原がみられることから、細胞性免疫が認識する抗原を検出する方法としても有用であることが指摘されている。また、上記方法を用いて患者IgG抗体が認識する癌抗原を単離した報告もなされている(Int. J. Cancer 72, 965-971, 1997、Cancer Res. 58, 1034-1041, 1998、Int. J. Cancer 29, 652-658, 1998、Int. J. Oncol. 14, 703-708, 1999、Cancer Res. 56, 4766-4772, 1996、Hum. Mol. Genet 6, 33-39, 1997)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、膵癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膵癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】

すなわち本発明の第1の発明は、配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白(hsp105)からなる抗原である。

【0008】

本発明の第2の発明は上記蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペ

プチド、およびそのペプチドからなる抗原である。

【0009】

上記ペプチドは下記(1)～(5)式からなるアミノ酸配列のペプチドであることが好ましい。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu … (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu … (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile … (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu … (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile … (5)

【0010】

本発明の第3の発明は、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA、及び配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白(HSP105)をコードするDNAである。

【0011】

本発明はまた上記ペプチドとアジュバンドとからなる抗癌ワクチンである。

【0012】

本発明はまた上記のDNAからなる抗癌ワクチンである。

【0013】

上記抗癌ワクチンはDNAとアジュバントとからなってもよい。

【0014】

本発明はまた上記蛋白のインビトロ刺激により誘導されたキラーT細胞である。

【0015】

本発明はまた上記蛋白の一部、またはペプチドをエピトープとし、インビトロ刺激により誘導されたCD4陽性ヘルパーT細胞である。

【0016】

本発明はまたDNAからなる膀胱癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断用プローブである。

【0017】

本発明はまた癌の診断用プローブ及び／又は上記抗体を含有することを特徴とする膵癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の診断薬である。

【0018】

本発明はまた上記抗体、及び／または上記キラーT細胞を含有することを特徴とする膵癌・大腸癌、脳腫瘍、悪性黒色腫、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、リンパ腫、食道癌、腎臓癌、前立腺癌、肺癌、乳癌、胃癌、肝癌、胆嚢癌、精巣癌、子宮癌、卵巣癌、肉腫の治療薬である。

【0019】

【発明の具体的な態様】

本発明につき詳しく説明する。

本発明の膵癌・大腸癌から採取された抗原は配列番号1に示されるアミノ酸配列からなる蛋白（以下「hsp105」という。）である。本発明における抗原である蛋白は、配列番号1に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ免疫誘導活性を有する蛋白を含む。

【0020】

ここで免疫誘導活性とは、抗体産生、細胞性免疫等の免疫反応を誘導する活性をいうが、なかでも、細胞傷害性T細胞（キラーT細胞／CTL）を刺激するT細胞誘導活性を有するものが特に好ましい。

【0021】

hsp105はhsp110／105ファミリーに属する高分子量の熱ショック蛋白で、hsp105 α と105 β からなっている。105 α は105kDaの熱ショック蛋白で、様々なストレスで誘導される。105 β は105 α のmRNAがスプライシングにより産生される105 α より分子量の小さい蛋白である。

。

【0022】

本発明の対象となるペプチドとしては、上記蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチドである。

【0023】

なかでもペプチドを構成するアミノ酸配列が下記(1)～(5)式のいずれかのアミノ酸配列からなるペプチドが好ましい。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu … (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu … (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile … (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu … (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile … (5)

【0024】

本発明のDNAは、配列番号2に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部を含むDNAを例示することができる。

【0025】

本発明は上記蛋白(hsp105)またはペプチド(ペプチド(1)～(5))の一部もしくは全部をエピトープ(抗原)として認識する抗体、及び／または、インビトロ刺激により誘導された細胞傷害性(キラー)T細胞(CTL)である。一般的に、CTLのほうが抗体よりも強い抗腫瘍活性を示す。

【0026】

上記本発明のDNAはそのままあるいはアジュバントに分散した状態で癌患部に抗癌ワクチンとして投与することができる。

【0027】

上記本発明のワクチンはそのままあるいはアジュバントに分散した状態で癌患部に抗癌ワクチンとして投与することができる。

【0028】

用いられるアジュバントとしては、フロイントの不完全アジュバント、BCG、トレハロースダイマイコレート(TDM)、リポ多糖(LPS)、ミョウバンアジュバント、シリカアジュバント等が挙げられるが、抗体の誘導能等の関係か

ら、フロイントの不完全アジュバント (F I A) を使用することが好ましい。

【0029】

本発明のDNAは各種ヒト癌のDNAを取り出してその相同性を調べることで診断用プローブとして使用することが出来る。また、このプローブや前記抗体を使用して癌診断薬として使用することが出来る。

【0030】

癌患者の癌細胞に対する免疫応答は予想以上に活発であり、多種多様な蛋白に対してI g G抗体が産生されていることを見出している。本発明の抗原蛋白であるh s p 1 0 5は後述の実施例に示すように膵癌・大腸癌で特異的に高発現する。

【0031】

本発明の前記蛋白やその一部に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記膵癌・大腸癌抗原h s p 1 0 5等の蛋白又はその一部を抗原として用いて常法により作製することができ、それらを用いて膵癌・大腸癌の診断に利用することができる。

【0032】

特異的抗腫瘍免疫療法の標的抗原となるためには、その抗原が細胞傷害性T細胞(キラーT細胞/C T L)の認識抗原であることが必要である。本発明の抗原は日本人に多いH L A-A 2 4において、インビトロにおけるキラーT細胞誘導活性を増大させた。このことから本発明の抗原を体内に注入することにより、C T Lを誘導活性化し、その結果、抗腫瘍効果が期待できる。また、本発明の抗原で刺激すると腫瘍部において活性化T細胞が誘導され、この活性化されたT細胞を体内に注入することによる養子免疫療法に有効に用いることができる。

【0033】

【実施例】

次に本発明の抗原、その製造方法、効果について実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら制約されるものではない。

《S E R E X法》

本発明の脾癌・大腸癌抗原である h s p 1 0 5 は例えば、下記実施例のような S E R E X 法で検出することができる。

【0034】

【実施例1】

《血清の採取》

脾癌患者から血清を採取した。採血後の血清は -80°C で保存した。この血清サンプルから、大腸菌とファージの溶解物とセファロース4Bが充填されたカラムを用いて大腸菌と λ ファージに対する抗体を除去した後、100～800倍に希釈し、使用した。

【0035】

《cDNAライブラリー／蛋白の作製》

Stratagene、La Jolla、CAより脾癌細胞株CFPAC-1のcDNAを λ ZAPエクスプレスベクターに挿入してあるファージcDNAライブラリーを購入した。このファージcDNAライブラリーを大腸菌に感染させた後、NZYプレート培地上で 42°C 、6時間培養し溶菌斑（プラーク）を作らせた。isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG) を浸透させたニトロセルロースメンブレンでプレートを 37°C で3時間覆うことにより、プラーク中で λ ファージに組み込んだcDNAがコードする蛋白を作らせた。

【0036】

《イムノスクリーニング》

上記方法で産生した蛋白をニトロセルロースメンブレンに転写した。ブロッキング後のニトロセルロースを洗浄し、前記血清と 4°C で15時間反応させた。洗浄後2次抗体としてHorseradish Peroxidase (HRP) 標識マウス抗ヒトIgG抗体をメンブレンと反応させた。洗浄した後に、化学発光をX線フィルム上で検出し、写真のプレートと照らし合わせ、陽性プラークを周囲の陰性プラークとともにピックアップした。発色反応陽性部位に一致するプラークを15cmNZYアガロースプレート上から採取し、SM緩衝液（100mMのNaCl、10mMのMgSO₄、50mMのTris-HCl、0.01%のゼラチン；pH7.5）に溶解させた。発色反応陽性プラークが単一化するまで上記と同様の方法で2

次、3次スクリーニングを繰り返し、血清中のIgG抗体が反応する単一のファージクローンを得た。以上の方法により腫瘍細胞株由来のcDNAから63個の陽性クローンを単離した。

【0037】

《単離抗原遺伝子の相同性検索》

PCR法によりインサートDNAを増幅し、以後の解析に用いた。得られたPCR産物をBig Dye DNA シーケンシングキット (PE Biosystems, CA) Aシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。上記決定された63種類の遺伝子の塩基配列を、それぞれ相同性検索プログラムBLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を用いて、NCBIデータバンクに登録されている遺伝子情報と比較した。

【0038】

《hsp105》

その結果、表1の18個の陽性クローンを認めた。その1個がhsp105であった。

【表1】

TABLE 1 Genes Isolated by SEREX of a Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line		
Gene designation	Gene/sequence identity	SEREX database search*
KM-PA-1	ap-2 (heat shock protein 110 family)	NGO-St-81, NY-CO-40, NY-CO-32
KM-PA-2	EST (KIAA0124)	—
KM-PA-3	β -actin	—
KM-PA-4	coactosin-like protein (CLP)	—
KM-PA-5	HALPHA44 (alpha-tubulin)	—
KM-PA-6	unknown	—
KM-PA-7	CDC-like kinase (CLEK)	—
KM-PA-8	cytokeratin 18	—
KM-PA-9	polyA binding protein	—
KM-PA-10	very-long-chain-acyl-CoA-dehydrogenase (VLCAD)	—
KM-PA-11	unknown	—
KM-PA-12	HLA-Cw heavy chain (MHC Class I)	LONY-BR-26
KM-PA-13	unknown	—
KM-PA-14	CGI 55 protein	—
KM-PA-15	glycosylation-inhibiting factor (GIF)	Mz19-16n, Hom-HD1-21
KM-PA-16	unknown	NGO-St-95, NGO-St-103
KM-PA-17	DNA binding protein A (dbpA)	—
KM-PA-18	heat shock protein 105 (KIAA0201)	NY-CO-25

* Dash means no strong homology.

【0039】

《hsp105発現の確認》

各種癌組織および正常組織における、hsp105蛋白の発現の有無を免疫組織化学的に解析した。その結果、図1および図2に示したようにhsp105は

肺癌組織及び大腸癌組織に発現することがわかった。

【0040】

【実施例2】

《hsp105を構成するペプチド》

日本人の60%が陽性のHLA-A24に結合するモチーフとBALB/cマウスのK^dの結合するモチーフはほとんど同じである。HLA-peptide binding prediction(http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/)を用いてHLA-A24とK^dの両方に結合すると予測されるヒト・マウスhsp105共通のペプチドをhsp105のシーケンスより選び出し、9または10のアミノ酸からなる9種類のペプチドをFmoc/PyBOP法で合成した。ペプチドのシーケンスとHLA-A24への結合予測値を表2に示す。

【表2】

hsp105由来ペプチド

hsp105-derived peptides			
No.	Position	Sequence	Binding Score
1	hsp105 180-188	NYGIYKQDL	2400
2	hsp105 214-223	AFNKGKLV	960
3	hsp105 251-260	KYKLDKSKI	2880
4	hsp105 305-313	QFEELCAEL	1382
5	hsp105 433-442	TFLRRGPFEL	1920
6	hsp105 570-579	MYIETEGKMI	4800
7	hsp105 597-606	ECVYEFKDL	80
8	hsp105 682-690	HYAKIAADF	60
9	hsp105 696-705	KYNHIDSEEM	432

【0041】

【実施例3】

《DNAワクチン》

マウスhsp105 cDNAを発現ベクターpCAGGSに組み込んだプラスミドDNAをそのまま適当な濃度に調整してワクチンとして以下の性能評価試験に使用した。なお、このマウスhsp105-pCAGGS DNAワクチンは大

腸菌を培養し、その後大腸菌からプラスミドDNAを取り出し、精製することにより大量に産生したものをを用いた。

【0042】

《ペプチドワクチンおよびDNAワクチンの抗癌効果》

BALB/cマウスの筋肉に①生理食塩水、②ベクターのみ、③hsp105 cDNAベクター、④アジュバントのみ、及び⑤アジュバント+ペプチドを注射し、同系マウス由来のhsp105を高発現する大腸癌細胞株Colon-26を背部皮下に移植して、マウスの癌の発症を（１）癌部の面積、（２）癌が生着したマウスの割合、（３）生存マウスの割合で評価した。結果を図3A、B、Cに示す。

【0043】

図3A、B、Cに示すように、 3×10^4 個のColon26を植えた場合、生食のみあるいは、pCAGGSのみを免疫したマウスには13日目までにそれぞれ5匹全例腫瘍が生着したが、hsp105-DNAエアクチンを免疫した5匹のうち、20日目に1匹、24日目に1匹腫瘍が生着したものの、残りの3匹は腫瘍を完全に拒絶した。アジュバント群は、24日目までに5匹全例腫瘍が生着した。DNAワクチン・ペプチドワクチン・アジュバント群と生食・ベクター群間に優位差を認めた（図3B）。腫瘍面積の平均においても同様の結果であった（図3A）。

【0044】

これらの結果からペプチドワクチンおよびDNAワクチンの抗癌剤としての効果は明らかである。全体の生存曲線でみると、生食・ベクター・アジュバント群は45日目でも5匹中2匹が生存しており、DNAワクチン群に至っては、5匹全例とも生存していた。DNAワクチン群は他の4群全てとの間に優位差を認めた。ペプチドワクチン群は生食・ベクター・アジュバント群との間に有意差をもって生存期間の延長を認めた（図3C）。更に、腫瘍を拒絶したマウスを病理学的に観察し、正常臓器への傷害がおこっていないことと、腫瘍を拒絶した局所に炎症細胞が多数浸潤していることを確認した。

【0045】

《hsp105のCTLエピトープペプチドの決定》

CTLエピトープペプチドを同定するため、DNAワクチン-ペプチドワクチ

ンが有効であったマウスより脾臓細胞を回収し、9種類のペプチドで1回刺激し、⁵¹Cr release assayによってColon-26に対する細胞傷害活性を検討した。その結果、上記9種のペプチドの中では、下記5種類のペプチド1、2、3、4、6が有用であることを認めた(図4)。

Asn-Try-Gly-Ile-Tyr-Lys-Gln-Asp-Leu ... (1)

Ala-Phe-Asn-Lys-Gly-Lys-Leu-Lys-Val-Leu ... (2)

Lys-Tyr-Lys-Leu-Asp-Ala-Lys-Ser-Lys-Ile ... (3)

Gln-Phe-Glu-Glu-Leu-Cys-Ala-Glu-Leu ... (4)

Met-Tyr-Ile-Glu-Thr-Glu-Gly-Lys-Met-Ile ... (5)

【0046】

《癌診断薬》

h s p 1 0 5の抗体を用いて、脾癌・大腸癌の病理診断をすることができる。

【0047】

《CTL癌治療薬》

マウスにおいてh s p 1 0 5および／又はh s p 1 0 5を構成するペプチドを抗原として認識するキラーT細胞は正常細胞を傷付けず、マウス大腸癌にのみ細胞傷害活性を有することがわかった。h s p 1 0 5は高発現するヒト脾癌・大腸癌における、副作用の少ない癌治療薬あるいは予防薬として使用することが出来る可能性がある。

【0048】

【発明の効果】

本発明の抗原蛋白、および抗原ペプチド、あるいは本発明の蛋白またはペプチドをコードするDNAは自己傷害性等の副作用が少なく優れた抗癌ワクチンとして使用することが出来る。また、抗体は診断薬として使用することができる。また本発明の抗原により刺激、活性化されたキラーT細胞は抗癌剤として使用できる。

【0049】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kumamoto Technology and Industry Fundation

<120> A protein to be an immunogenic antigen for pancreatic cancer

<130> KTL-052

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

MSVVGLDVGSQSCYIAVARAGGIETIANEFSDRCTPSVISFGSKNRTIGVAAKNQQITHANNITVSNFKRFHG
RAFNDPFIQKEKENLSYDLVPLKNGGVGKVMYMGEEHLSVEQITAMLLTKLKETAENSLKKPVTDCVISV
PSFFTDERRSVLDAAQIVGLNCLRLMNDMTAVALNYGIYKQDLP SLDEKPRIVVFVDMGHSAFQVSACAFN
KGKLVLTAFDPFLGGKNFDEKLVEHFCAEFKTKYKLDASKIRALLRLYQECEKLKKLMSSNSTDLPLNI
ECFMNDKDVSGKMNRSQFEELCAELLQKIEVPLYSLLEQTHLKVEDVSAVEIVGGATRIPAVKERIAKFFGK
DISTTLNADEAVARGCALQCAILSPAFAKVRFSVTDVFPFISLIWNHDSDETEGVHEVFSRNHAAPFSKVL
TFLRRGPFEEAFYSDPQGVPEAKIGRFVQNVSAQKDGEKSRVKVKVRVNTHGIFTISTASMVEKVPTE
ENEMSSEADMECLNQRPPENPDTDKNVQQDNSEAGTQPQVQTDAAQTSQSPPSPELTSEENKIPDADKANEK
KVDQPPEAKPKIKVNVNVELPIEANLVWQLGKDLLNMYIETEGKMIMQDKLEKERNDAKNAVEEYVYEFDRK
LCGPYEKFICEQDHQNFLRLLTETEDWLYEEGEDQAKQAYVDKLEELMKIGTPVKVRFQEAERPKMFEELG
QRLQHYAKIAADFRNKDEKYNHIDESEMKKVEKSVNEVMEWMNNVMNAQAKKSLDQDPVVRAQEIKTKIKEL
NNTCEPVVTQPKPKIESPKLERTPNGPNIDKKEEDLEDKNNFGAEPHQNGECYPNEKNSVNMDDL

【0050】

<210> 2

<211> 3612

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

1 gaggaagtgg gacctccct tttgggtcgg tagttcagcg ccggcgccgg tgtgcga

gcc 61 gcggcagagt gaggcaggca acccgaggtg cggagcgacc tgcggaggct gaggc
cccgt 121 ttctcccagg gtttcttatt agccagccgc cgctgtcccc gggggagtag g
aggctcctg 181 acaggccgcg gctgtctgtg tgtccttctg agtgtcagag gaacggcca
g accccgcggg 241 ccggagcaga acgcggccag ggcagaaagc ggcggcagga gaagca
ggca gggggccgga 301 ggacgcagac cgagaccga ggcggaggcg gaccgcgagc cgg
ccatgtc ggtggtggg 361 ttggacgtgg gctcgcagag ctgctacatc gcggtagccc
gggccggggg catcgagacc 421 atcgccaatg agttcagca ccggtgcacc ccgtcagt
ca tatcatttgg atcaaaaaat 481 agaacaatcg gagttgcagc caaaaatcag caaat
cactc atgcaaaca tacggtgtct 541 aacttcaaaa gatttcattg ccgagcattc aa
cgaccctc tcattcaaaa ggagaaggaa 601 aacttgagtt acgatttggg tccattgaaa
aatggtggag ttggaataaa ggtaatgtac 661 atgggtgaag aacatctatt tagtgtg
gag cagataacag ccatgttgtt gactaagctg 721 aaggaaactg ctgaaaacag cctc
aagaaa ccagtaacag attgtgttat ttcagtcacc 781 tccttcttta cagatgtga g
aggcgatct gtgttagatg ctgcacagat tgttggccta 841 aactgtttta gacttatga
a tgacatgaca gctgttgctt tgaattacgg aatttataag 901 caggatctcc caagcc
tgga tgagaaacct cggatagtggt ttttgttga tatgggacat 961 tcagcttttc aag
tgtctgc ttgtgctttt aacaaggga aattgaaggt actgggaaca 1021 gcttttgatc
ctttcttagg aggaaaaaac ttcgatgaaa agttagtga acatttctgt 1081 gcagaatt
ta aaactaagta caagttggat gcaaaatcca aaatacgagc actcctacgt 1141 ctgta
tcagg aatgtgaaaa actgaaaaag ctaatgagct ctaacagcac agaccctcca 1201 ct
gaatatcg aatgctttat gaatgataaa gatgtttccg gaaagatgaa caggtcacia 1261
tttgaagaac tctgtgctga acttctgcaa aagatagaag tacccttta ttcactgttg 1
321 gaacaaactc atctcaaagt agaagatgtg agtgcagttg agattgttg aggcgctaca
1381 cgaattccag ctgtgaagga aagaattgcc aaattctttg gaaaagatat tagcacaaca
1441 ctcaatgcag atgaagcagt agccagagga tgtgcattac agtgtgcaat actttcc
ccg 1501 gcatttaaag ttagagaatt ttccgtcaca gatgcagttc cttttccaat atct
ctgac 1561 tggaacctg attcagaaga tactgaaggt gttcatgaag tctttagtcg a
aaccatgct 1621 gtcctttct ccaaagttct cacctttctg agaagggggc cttttgagc
t agaagctttc 1681 tattctgac cccaaggagt tccatatcca gaagcaaaaa taggcc

gctt tgtagttcag 1741 aatgtttctg cacagaaaga tggagaaaaa tctagagtaa aag
tcaaagt gcgagtcaac 1801 acccatggca ttttcacat ctctacggca tctatggtgg
agaaagtcac aactgaggag 1861 aatgaaatgt cttctgaagc tgacatggag tgtctgaa
tc agagaccacc agaaaacca 1921 gacactgata aaaatgtcca gcaagacaac agtga
agctg gaacacagcc ccaggtacaa 1981 actgatgctc aacaaacctc acagtctccc cc
ttcacctg aacttacctc agaagaaaac 2041 aaaatcccag atgctgacaa agcaaagtaa
aaaaaagtig accagcctcc agaagctaaa 2101 aagcccaaaa taaaggtggt gaatgtt
gag ctgcctattg aagccaactt ggtctggcag 2161 ttagggaaag accttcttaa catg
tatatt gagacagagg gtaagatgat aatgcaagat 2221 aaattggaaa aagaaaggaa t
gatgctaaa aatgcagttg aggaatatgt gtatgagttc 2281 agagacaagc tgtgtggac
c atatgaaaaa tttatatgtg agcaggatca tcaaaatfff 2341 ttgagactcc tcacag
aaac tgaagactgg ctgtatgaag aaggagagga ccaagctaaa 2401 caagcatatg ttg
acaagtt ggaagaatta atgaaaattg gcactccagt taaagttcgg 2461 tttcaggaag
ctgaagaacg gccaaaaatg tttgaagaac taggacagag gctgcagcat 2521 tatgccaa
ga tagcagctga cttcagaaat aaggatgaga aatacaacca tattgatgag 2581 tctga
aatga aaaaagtgga gaagtctgtt aatgaagtga tggaatggat gaataatgtc 2641 at
gaatgctc aggctaaaaa gagtcttgat caggatccag ttgtacgtgc tcaggaaatt 2701
aaaacaaaaa tcaaggaatt gaacaacaca tgtgaaccg ttgtaacaca accgaaacca 2
761 aaaattgaat caccctaaact ggaaagaact ccaaatggcc caaatattga taaaaaggaa
2821 gaagatttag aagacaaaaa caattttggt gctgaacctc cacatcagaa tggatgaatgt
2881 taccctaatg agaaaaattc tgtaatatg gacttggact agataacctt aaattgg
cct 2941 attccttcaa ttaataaaat atttttgcca tagtatgtga ctctacataa cata
ctgaaa 3001 ctatttatat tttctttttt aaggatattt agaaattttg tgtattatat g
gaaaaagaa 3061 aaaaagctta agtctgtagt ctttatgatc ctaaaaggga aaattgcct
t ggtaactttc 3121 agattcctgt ggaattgtga attcatacta agctttctgt gcagtc
tcac catttgcac 3181 actgaggatg aaactgactt ttgtcttttg gagaaaaaaa act
gtactgt tgttcaagag 3241 ggctgtgatt aaaatcttta agcatttgtt cctgccaaagg
tagttttctt gcattttgct 3301 ctccattcag catgtgtgtg ggtgtggatg tttataaa
ca agactaagtc tgacttcata 3361 agggctttct aaaaccattt ctgtccaaga gaaaa

tgact ttttgctttg atattaaaaa 3421 ttcaatgagt aaaacaaaag ctagtcaaat gt
gtagcag catgcagaac aaaaacttta 3481 aactttctct ctactatac agtatattgt
caatgtgaaa gtgtggaatg gaagaaatgt 3541 cgatcctgtt gtaactgatt gtgaaca
ctt ttatgagctt taaaataaag ttcatttat 3601 ggtgtcattt ct

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は膵癌における h s p 1 0 5 の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：膵癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱い h s p 1 0 5 蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。

【図 2】 図 2 は大腸癌における h s p 1 0 5 の免疫組織化学的解析結果を示した顕微鏡写真である。

A：大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色、CA：癌部、NP：非癌部を示す。

B：癌細胞に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。

C：非癌部の強拡大。細胞質に弱い h s p 1 0 5 蛋白の発現を認める。

D：癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に h s p 1 0 5 蛋白の高発現を認める。核にも弱い発現を認める。

【図 3】 図 3 はマウス大腸癌細胞Colon-26に対する h s p 1 0 5 のDNAワクチン、および h s p 1 0 5 ペプチドワクチン、及び対照品の抗癌効果を示したグラフである。Aは癌部の面積を、Bは癌が生着したマウスの割合、Cは生存マウスの割合を示す。

【図 4】 図 4 は h s p 1 0 5 蛋白由来の各種ペプチドワクチンまたは h s p 1 0 5 蛋白をコードするDNAワクチンのColon-26に対する細胞傷害活性を 5 1 C r release assayにより測定した結果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

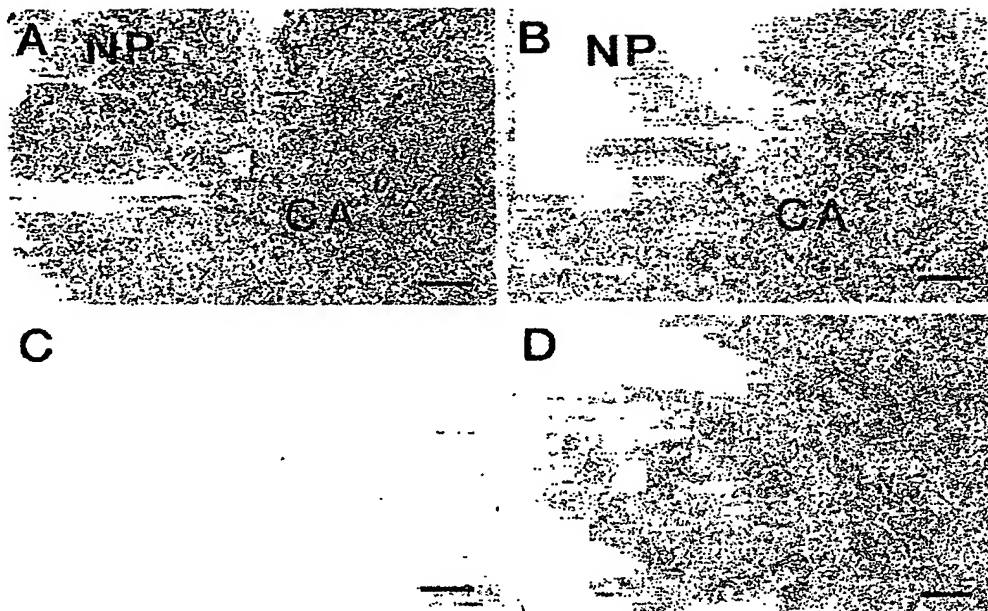


図 1 膵癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

- A. 膵癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、NP: 非癌部。癌部は癌細胞、間質細胞、炎症細胞を含む。非癌部は腺細胞、島細胞、膵管細胞を含む。
- B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。
- C. 非癌部の強拡大。細胞質に弱い hsp105 蛋白の発現を認める。
- D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。
- 倍率; x 18 (A, B), x 45 (C, D).
- スケールバー 500 μ m (A, B), 200 μ m (C, D).

【図 2】

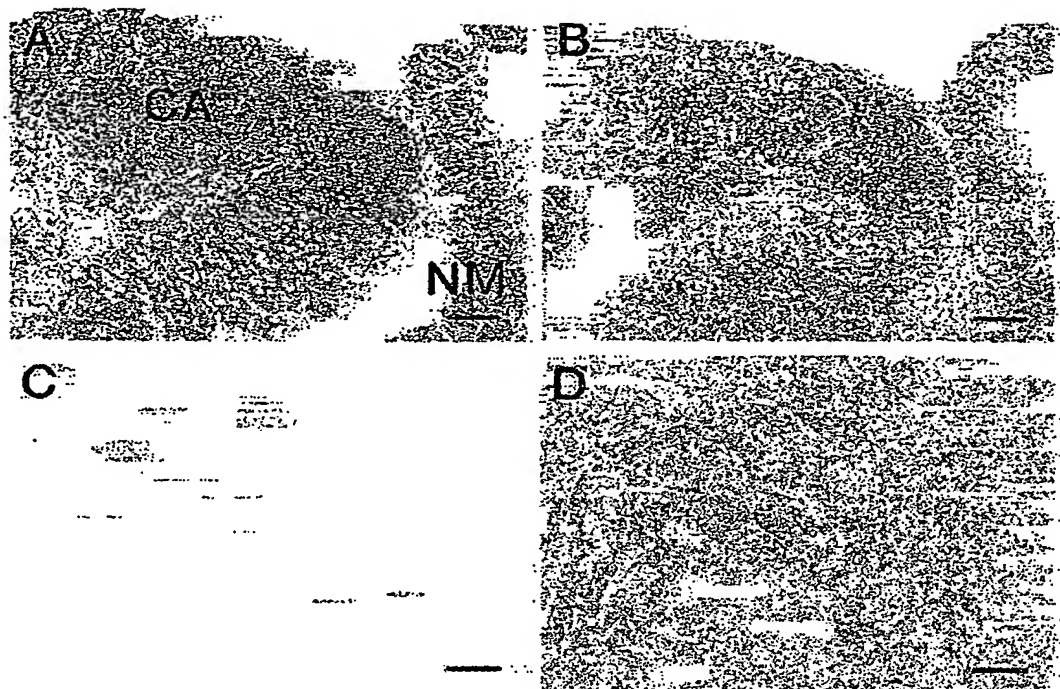
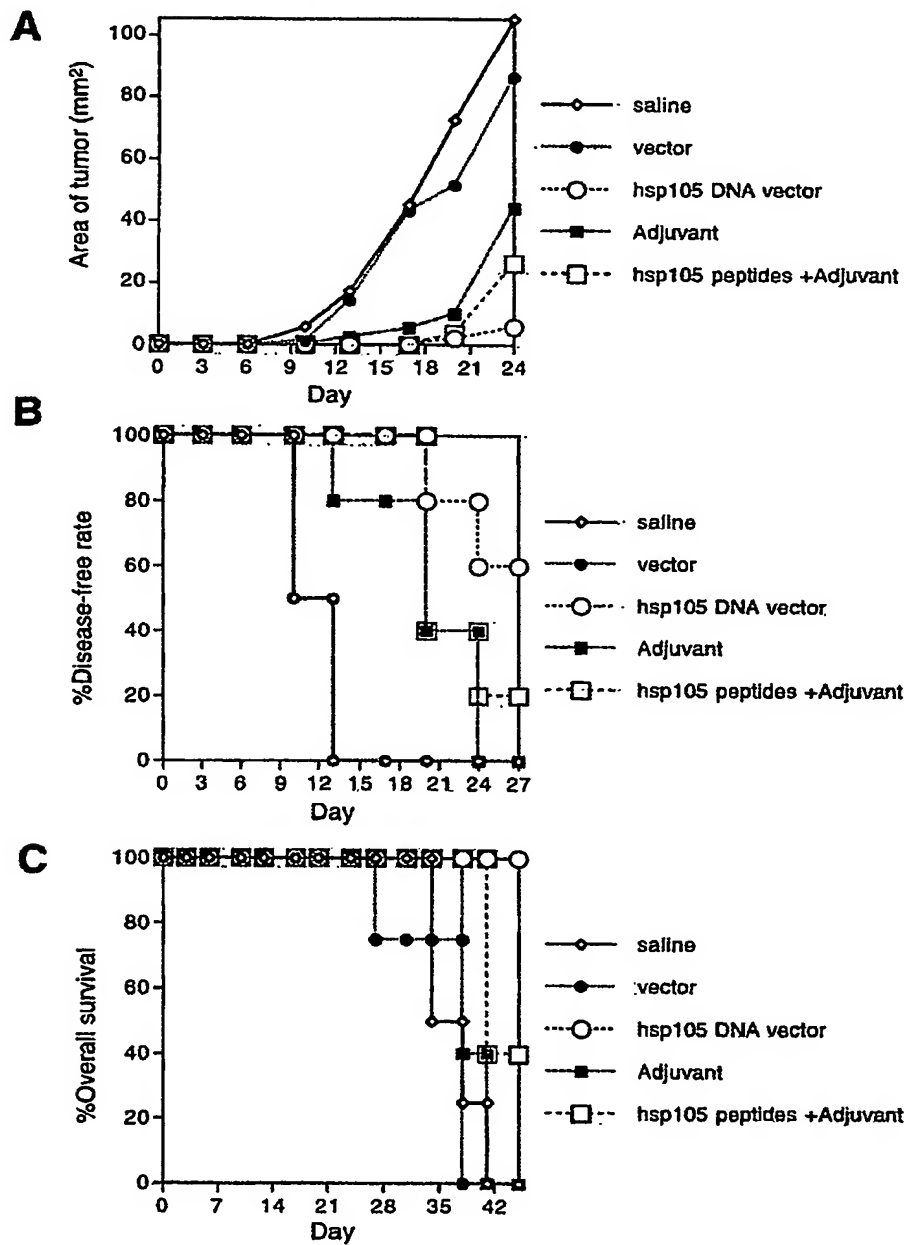


図 2 大腸癌における hsp105 の免疫組織化学的解析

- A. 大腸癌と周囲の非癌部のヘマトキシリン・エオジン染色。CA: 癌部、NM: 非癌部
B. 癌細胞に hsp105 蛋白の高発現を認める。非癌部にも弱い発現を認める。
C. 非癌部の強拡大。弱い hsp105 蛋白の発現を認める。
D. 癌部の強拡大。癌細胞の主に細胞質に hsp105 蛋白の高発現を認める。核にも弱い発現を認める。
倍率; $\times 9$ (A, B), $\times 90$ (C, D).
スケールバー: 1mm (A, B), 100 μ m (C, D).

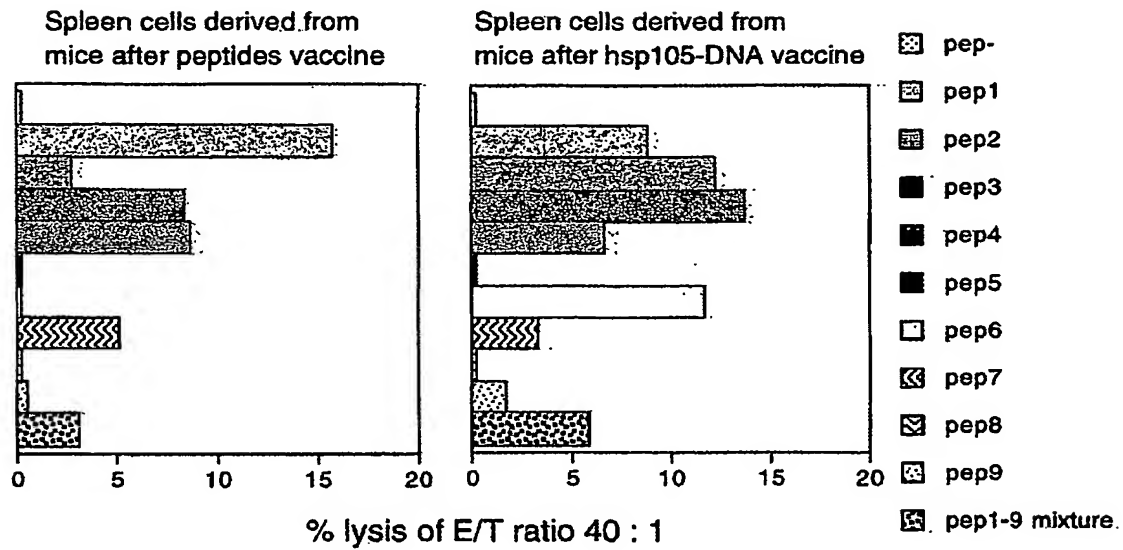
【図3】

hsp105のDNAワクチンの接種はマウスに大腸癌細胞株Colon-26の拒絶を誘導する



【図 4】

hsp105由来CTLエピートープの同定



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 膵癌・大腸癌をはじめとする各種癌や腫瘍の診断・治療に応用することができるヒト膵癌・大腸癌抗原や、それをコードする遺伝子、それを用いた抗癌ワクチン等を提供する。

【解決手段】 下記のいずれか。

(a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなる蛋白からなる抗原。

(b) 上記の蛋白の一部からなり、かつ免疫誘導活性を有するペプチド、及び該ペプチドを含む抗癌ワクチン。

(c) 配列番号 2 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA、該 DNA を含む抗癌ワクチン。

【選択図】

なし

職権訂正履歴（書類修正）

特許出願の番号	特願 2002-255668
受付番号	50201301920
書類名	特許願
担当官	野本 治男 2427
作成日	平成14年 9月27日

<修正内容>

発明の詳細な説明の配列表の後尾に図面の簡単な説明の項目の書き込みがあるため、項目名を改行をする。

次頁無

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-255668
受付番号	50201301920
書類名	特許願
担当官	野本 治男 2427
作成日	平成14年10月 3日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 8月30日
-------	-------------

次頁無

特願 2 0 0 2 - 2 5 5 6 6 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[8 0 1 0 0 0 0 5 0]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

熊本県上益城郡益城町大字田原 2 0 8 1 番地 1 0

氏 名

財団法人くまもとテクノ産業財団